

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局(43) 国際公開日  
2003 年 7 月 31 日 (31.07.2003)

PCT

(10) 国際公開番号  
WO 2003/062418 A1(51) 国際特許分類: C12N 15/09, C12Q  
1/68, G01N 33/50, 33/53, 33/566, 33/58LTD.) [JP/JP]; 〒151-0072 東京都 渋谷区 幡ヶ谷 2 丁  
目 4 3 番 2 号 Tokyo (JP).

(21) 国際出願番号: PCT/JP2003/000668

(72) 発明者; および

(22) 国際出願日: 2003 年 1 月 24 日 (24.01.2003)

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 小池 尚  
(KOIKE, Hisashi) [JP/JP]; 〒151-0072 東京都 渋谷区  
幡ヶ谷 2 丁目 4 3 番 2 号 オリンパス光学工業株式  
会社内 Tokyo (JP). 長岡 智紀 (NAGAOKA, Tomonori)  
[JP/JP]; 〒151-0072 東京都 渋谷区 幡ヶ谷 2 丁目  
4 3 番 2 号 オリンパス光学工業株式会社内 Tokyo  
(JP). 佐藤 卓朋 (SATO, Takatomo) [JP/JP]; 〒151-0072  
東京都 渋谷区 幡ヶ谷 2 丁目 4 3 番 2 号 オリン  
パス光学工業株式会社内 Tokyo (JP). 金子 善興  
(KANEKO, Yoshiaki) [JP/JP]; 〒151-0072 東京都 渋谷  
区 幡ヶ谷 2 丁目 4 3 番 2 号 オリンパス光学工業株式  
会社内 Tokyo (JP). 畑中 みどり (HATANAKA, Midori)

(25) 国際出願の言語: 日本語

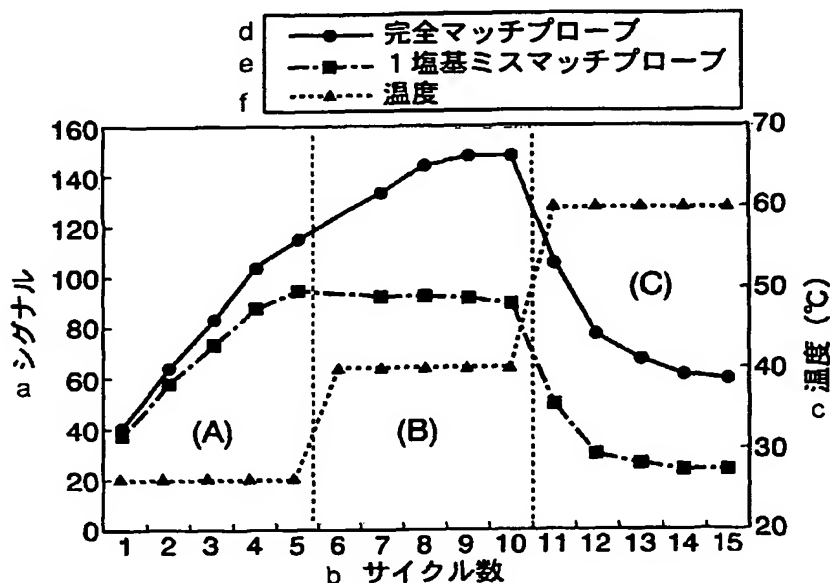
(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:  
特願2002-17272 2002 年 1 月 25 日 (25.01.2002) JP  
特願2002-247023 2002 年 8 月 27 日 (27.08.2002) JP(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): オリン  
パス光学工業株式会社 (OLYMPUS OPTICAL CO.,

[続葉有])

(54) Title: METHOD AND APPARATUS FOR DETECTING NUCLEIC ACID DATA

(54) 発明の名称: 核酸情報の検出方法及び装置



a...SIGNAL  
b...CYCLE COUNT  
c...TEMPERATURE (°C)  
d...COMPLETELY MATCHING PROBE  
e...SINGLE NUCLEOTIDE MISMATCHING PROBE  
f...TEMPERATURE

(57) Abstract: It is intended to provide a method of detecting the data of a target nucleic acid comprising bringing the target nucleic acid into contact with a probe having a sequence being complementary to at least a part of the target nucleic acid sequence to form a hybrid of the target nucleic acid with the probe, and measuring a signal generated in an amount depending on the amount of the hybrid to thereby detect the data of the target nucleic acid, wherein the signal data are kinetically obtained. It is also intended to provide a method of detecting the data of a target nucleic acid comprising bringing the target nucleic acid into contact with a completely matching probe being completely complementary to at least a part of the target nucleic acid sequence and one or more incompletely matching probes having a variation in at least a part of the completely matching probe to form hybrids of the target nucleic acid with the completely matching probe and with the incompletely matching probe, and detecting the data of the target nucleic acid based on the difference in the binding strength between the

hybrids, characterized in that the signal data are kinetically obtained while continuously or stepwise altering the conditions of measuring or detecting the signals generated from the hybrids.

[続葉有])



[JP/JP]; 〒151-0072 東京都渋谷区幡ヶ谷2丁目43番2号オリンパス光学工業株式会社内 Tokyo (JP). 福岡 荘尚 (FUKUOKA, Morinao) [JP/JP]; 〒151-0072 東京都渋谷区幡ヶ谷2丁目43番2号オリンパス光学工業株式会社内 Tokyo (JP). 坂本 宙子 (SAKAMOTO, Hiroko) [JP/JP]; 〒151-0072 東京都渋谷区幡ヶ谷2丁目43番2号オリンパス光学工業株式会社内 Tokyo (JP). 米川 裕之 (YONEKAWA, Hiroyuki) [JP/JP]; 〒151-0072 東京都渋谷区幡ヶ谷2丁目43番2号オリンパス光学工業株式会社内 Tokyo (JP).

OM, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SI, SK, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(74) 代理人: 志賀 正武, 外 (SHIGA, Masatake et al.); 〒169-8925 東京都新宿区高田馬場三丁目23番3号 ORビル Tokyo (JP).

添付公開書類:  
— 国際調査報告書  
— 補正書

(81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ,

補正されたクレームの公開日: 2004年4月1日

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

#### (57) 要約:

本発明は、標的核酸と、当該標的核酸配列の少なくとも一部に対して相補的な配列を有するプローブとを接触させ、当該標的核酸と当該プローブとの間にハイブリッドを形成させ、当該ハイブリッドの量に依存した量で発せられるシグナルを測定することにより、当該標的核酸の情報を検出する方法において、当該シグナルのデータ取得をカイネティックに行うことを含むの核酸情報検出方法を提供する。

本発明は更に、標的核酸の配列の少なくとも一部に対して完全に相補的な完全マッチプローブ、及び当該完全マッチプローブの少なくとも一部が変異した1以上の種類の不完全マッチプローブを、当該標的核酸と接触させ、当該標的核酸と当該完全マッチプローブ又は当該不完全マッチプローブとの間にハイブリッドを形成させ、当該ハイブリッドの結合強度の違いに基づいて当該標的核酸の核酸情報を検出する方法において、当該ハイブリッドが発するシグナルを測定または検出する条件を連続的または段階的に変更しながら、当該シグナルのデータ取得をカイネティックに行うことを含むことを特徴とする核酸情報検出方法を提供する。

補正書の請求の範囲 [2003年7月8日(08.07.03) 国際事務局受理: 出願当初の請求の範囲1は補正された; 他の請求の範囲は変更なし。(3頁)]

1. 標的核酸と、当該標的核酸配列の少なくとも一部に対して相補的な配列を有し、担体に固相化されたプローブとを接触させ、当該標的核酸と当該プローブとの間にハイブリッドを形成させ、当該ハイブリッドの量に依存した量で発せられるシグナルを測定することにより、当該標的核酸の情報を検出する方法において、

当該シグナルのデータ取得をカイネティックに行うことを含む、核酸情報の検出方法。

2. 前記のシグナルのデータ取得が、反応の測定条件または検出条件を変更しながら行われる、請求項1に記載の方法。

3. 前記のシグナルのデータ取得が、反応温度、又は反応溶液の組成、容量、若しくは種類のうちの少なくとも1つを変更しながら行われる、請求項2に記載の方法。

4. 前記の変更が、反応温度についての変更である、請求項3に記載の方法。

5. 標的核酸の配列の少なくとも一部に対して完全に相補的な完全マッチプローブ、及び当該完全マッチプローブの少なくとも一部が変異した1以上の種類の不完全マッチプローブを、当該標的核酸と接触させ、当該標的核酸と当該完全マッチプローブ又は当該不完全マッチプローブとの間にハイブリッドを形成させ、当該ハイブリッドの結合強度の違いに基づいて当該標的核酸の核酸情報を検出する方法において、

当該ハイブリッドが発するシグナルを測定または検出する条件を連続的または段階的に変更しながら、当該シグナルのデータ取得をカイネティックに行うことを含む、核酸の核酸情報を検出する方法。

6. 前記のシグナルのデータ取得が、反応温度、又は反応溶液の組成、容量、若しくは種類のうちの少なくとも1つを変更しながら行われる、請求項5に記載の方法。

7. 前記の変更が、反応温度についての変更である、請求項6に記載の方法。

8. 前記の反応温度についての変更が、検出するハイブリッドのT<sub>m</sub>値未満の温度から、T<sub>m</sub>値を越える温度間の温度上昇である、請求項7に記載の方法。

9. 前記の反応温度についての変更が、検出するハイブリッドのT<sub>m</sub>値未満の温度から、T<sub>m</sub>値を越える温度間の温度上昇及び温度下降からなる1回または複数回の温度サイクルである、請求項7に記載の方法。

10. 前記の温度上昇の間にシグナル強度の極大値を測定することを含む、請求項8又は9に記載の方法。

11. 前記の温度上昇の間にシグナル強度の変化量を測定することを含む、請求項8又は9に記載の方法。

12. 前記のハイブリッドが発するシグナルを測定する温度を連続的又は段階的に上昇させ、当該ハイブリッドから発せられるシグナル強度の変化量を測定し、その変化量が負に転じた時にその温度を維持することを含む、請求項5乃至11の何れか一項に記載の方法。

13. 同一の反応条件を適用することが可能な同一の系内において、複数種類のプローブを使用し、複数種類の核酸についての情報を同時に検出することを特徴とする請求項1乃至12の何れか一項に記載の方法。

14. 前記プローブが複数種類の配列を有する複数種類のプローブであって、当該プローブ同士が、互いに重なり合う配列を有することを特徴とする、請求項1乃至13のいずれか一項に記載の方法。

15. 前記の複数種類の配列を有するプローブが、標的核酸の配列の少なくとも一部に対して完全に相補的な完全マッチプローブ、及び当該完全マッチプローブの少なくとも一部が変異した1種類以上の不完全マッチプローブと、当該完全マッチプローブ及び当該不完全マッチプローブの両端あるいは片端において塩基配列を伸縮するか、または短縮したオーバーラッピングプローブとからなることを特長とする、請求項1乃至14のいずれか一項に記載の方法。

16. オーバーラッピングプローブのうち、より低い  $T_m$  値を有するプローブ群で解析した結果と、より高い  $T_m$  値を有するプローブ群で解析した結果を比較することによって判定することを含む請求項1乃至15のいずれか一項目に記載の方法。

17. 前記の配列のプローブが K-ras codon12 を解析することを目的とした 20mer の塩基配列を持つことを特徴とする配列番号 56 番から 69 番までのプローブを有することを特徴とする請求項1乃至16のいずれか一項目に記載の方法。

18. 前記の配列のプローブが K-ras codon12 を解析することを目的とした 17mer の塩基配列を持つことを特徴とする配列番号 70 番から 83 番までのプローブを有することを特徴とする請求項1乃至17のいずれか一項目に記載の方法。

19. 前記の配列のプローブが K-ras codon12 を解析することを目的とした 17mer の塩基配列を持つことを特徴とする配列番号 56 番から 83 番までのプローブと K-ras codon12 を解析することを目的とした 20mer の塩基配列を持つことを特徴とする配列番号 70 番から 83 番までのプローブを有することを特徴とする請求項1乃至18のいずれか一項目に記載の方法。

20. 前記のハイブリッド形成が、標的核酸を含む液体試料を、多孔質体に

固定されたプローブに接触させることにより行われる、請求項 1 乃至 19 の何れか一項に記載の方法。

21. 前記の液体試料を、前記の多孔質体内を 1 回又は複数回往復させる工程を行うことを含む、請求項 20 に記載の方法。

22. 前記のシグナルの検出を、蛍光標識の検出に基づいて行う、請求項 1 乃至 21 の何れか一項に記載の方法。

23. 標的核酸が、癌遺伝子、細胞内薬剤耐性遺伝子、細胞周期制御遺伝子、若しくはアポトーシス関連遺伝子の何れか、又はこれらの組合せである、請求項 1 乃至 22 の何れか一項に記載の方法。

24. 標的核酸を含む試料を入れるための試料貯蔵容器、核酸を固定できる多孔質構造体を含み且つ当該容器と接続された核酸反応担体、当該試料が当該容器と当該核酸反応担体との間で、制御されながら漏れなく流動するための駆動手段、当該反応担体上での反応温度を制御するための温度制御手段、及び当該多孔質構造体において形成される標的核酸とプローブとの間のハイブリッドから発せられるシグナルを検出するための手段を含む核酸情報解析装置。

25. 前記の核酸反応担体へと接続され且つ標的核酸を含む試料とは異なる種類の溶液を貯蔵するための 1 以上の溶液貯蔵容器、及び適宜当該溶液貯蔵容器に含まれる各種の溶液を混合して前記核酸反応担体へと送る手段を更に含む、請求項 24 に記載の核酸情報解析装置。

26. 標的核酸が、癌遺伝子、細胞内薬剤耐性遺伝子、細胞周期制御遺伝子、若しくはアポトーシス関連遺伝子の何れか、又はこれらの組合せである、請求項 24 又は 25 に記載の核酸情報解析装置。